

## 細胞内サイトカイン染色プロトコール

### Application Notes:

1. in vivo刺激の組織由来もしくはin vitroで特異抗原やマイトジェンにより誘導培養された細胞を準備します。4～6時間の刺激培養により誘導されたサイトカインをbrefeldin A (Cat. No. 420601)、monensin (Cat. No. 420701)等でタンパク質輸送を阻害することが重要です。12 x 75 mmプラスチックチューブやマイクロプレートに懸濁して染色することができます。
2. サイトカイン/ケモカインの種類によって産生時間のピークが異なるため、最適なシグナルを得るために刺激する条件をあらかじめ確認しておく必要があります。
3. 細胞表面抗原は、固定、変性により抗体の反応性が減弱するものがあります。そのため固定する前に細胞表面の染色を行い、その後細胞内染色のために固定、膜透過処理をすることをお勧めします。細胞表面染色前に固定した細胞での方法に変更する場合は、パラフォルムアルデヒド固定による変性抗原に反応する抗体クローンでの経験的な確認が必要です。

### 固定

4. IFN- $\gamma$ やIL-4等の細胞内抗原の染色の前に細胞表面免疫染色プロトコールに基づき、細胞表面の染色を行います。その後、遠心後の細胞ペレットに0.5 mlのFixation Buffer (Cat. No.420801)を各チューブに加え、室温、暗所20分間置きます。
5. 350 x g、5分間遠心し、上清を除きます。

### サンプルの凍結保管(オプション)

6. このステップでサンプルを保管し、染色、解析を後でする場合は一旦Cell Staining Bufferで細胞を洗浄します。
7. 短時間の保管はCell Staining Bufferに再懸濁し、4°Cで保管します。長期の保管の場合、細胞膜表面を染色せずに固定した細胞を90% FCS/10% DMSOで懸濁し、-80°Cで凍結保管します。例えば臨床サンプルで刺激培養ヒトPBMCをこのステップで保管しておいて、まとめて続きの染色をおこなったり、シングルドナーでの長期の研究にこの方法は便利です。

### 細胞膜透過処理

8. 10倍濃度の Permeabilization Wash Buffer (Cat. No. 421002)を蒸留水で1倍濃度に調製します。
9. 固定した細胞をPermeabilization Wash Bufferに再懸濁し、350 x gで5～10分間遠心します。
10. ステップ9を2回繰り返します。

### 細胞内染色

11. 遠心後の上清を除き、残ったPermeabilization Wash Bufferで懸濁し、最適な濃度の目的の蛍光標識抗体(例抗IFN- $\gamma$  PE)および適切なネガティブコントロール抗体を加え、室温、暗所で20分間置きます。

### 洗浄

12. 2mlのPermeabilization Wash Bufferを加え、350 x gで5分間遠心し上清を除きます。
13. もう一度繰り返し、洗浄します。

## 細胞内サイトカイン染色プロトコール

### ビオチン標識抗体の場合(オプション)

14. 細胞内染色がビオチン標識の1次抗体の場合は、蛍光標識Streptavidinを反応後にPermeabilization Wash Bufferで洗浄します。

### FCM

15. 0.5 ml Cell Staining Bufferに再懸濁し、適切なコントロールと共に解析します。

Note: 特異的な抗サイトカインの反応か確認するために、未標識抗サイトカイン抗体やリコンビナントサイトカインを用いたブロッキングをしたネガティブコントロールをたてることを推奨します。

### 末梢血サンプル

1. ヘパリン採血した末梢血に適した無菌の培養液で1:1に希釈します。
2. 抗原やマイトジェンで刺激培養します。IFN- $\gamma$ やIL-4のようなサイトカインの細胞内染色の場合はタンパク質輸送を阻害するbrefeldin A (Cat. No.420601) もしくはmonensin (Cat. No. 420701)を使用することが重要です。刺激剤を加えた後、12 x 75 mm チューブに200 $\mu$ lずつ分注し、4-6時間、5% CO<sub>2</sub>、37°Cでインキュベートします。
3. 2 ml の1倍濃度 Red Blood Cell Lysis Buffer (Cat. No. 420301) を加え5~10分間置きます。
4. 350 x g、5分間遠心し、上清を除きます。
5. 1倍濃度の Cell Staining Bufferで洗浄し、細胞表面免疫染色を行います。
6. 固定、膜透過処理をした後、細胞内染色を行います。

### FCM

7. 細胞表面免疫染色した適切なコントロールで機器設定を行います。
8. ブロッキングコントロール、アイソタイプコントロールで4分画マーカを設定します。適切なFCM解析のために光学顕微鏡で確認したり、サンプルが懸濁された状態の散乱光パターンであることを確認してください。ドットプロットやコンタープロットを用いて細胞表面抗原と細胞内サイトカインの発現の%やパターンとして解析します。

### Related Information:

1. Jung T, *et al.* 1993. *J. Immunol. Methods* 159:197.
2. Vikingsson A., *et al.* 1994. *J. Immunol. Methods* 173:219.
3. Prussin C., *et al.* 1995. *J. Immunol. Methods* 188:117.
4. Elson, L.H., *et al.* 1995. *J. Immunol.* 1995. 154:4294.
5. Assenmacher, M., *et al.* 1994. *Eur. J. Immunol.* 24:1097.

### Reagent List:

1. Cell Staining Buffer (Cat. No. 420201)
2. Monensin (Cat. No. 420701)
3. RBC Lysis Buffer (Cat. No. 420301)
4. Brefeldin A (Cat. No. 420601)
5. Fixation Buffer (Cat. No. 420801)
6. Permeabilization Wash Buffer (Cat. No. 421002)

トミーデジタルバイオロジー株式会社  
カスタマーサポート

〒110-0008東京都台東区池之端2-9-1  
TEL : 03-5834-0843 Fax : 03-5815-0813  
mail : [Biolegend@digital-biology.co.jp](mailto:Biolegend@digital-biology.co.jp)